



THE EFFECT OF Fe^{2+} DAN Mn^{2+} IONS TOWARD β -CAROTENE PRODUCTIVITY BY PHYTOPLANKTON *Isochrysis aff galbana* (T-iso)

^aErna mayasari, Indah Raya & Hasnah Natsir

Chemistry Department, Faculty of Mathematics & Natural Sciences
Hasanuddin University Makassar 90245

^aE-mail : ernamayasari.unhas@yahoo.com

ABSTRACT

The research aimed to find out the effect of Fe^{2+} and Mn^{2+} towards β -carotene productivity as result of oxidative stress from photosystem (PS II). The phytoplankton *Isochrysis aff galbana* (T-iso) were the microalgae species which had the high lipid content primarily and had potentiality to produce β -carotene as the β -carotene supplement. Analysis method was carried out by the sonication extraction for short and cheap in the lysis cell of phytoplankton biomass, infra red (IR) to find out the interaction metal ion and UV/VIS spectrophotometer to determine β -carotene concentration. The research result indicated that Fe^{2+} has higher impact than Mn^{2+} on the β -carotene productivity. The interaction of ions metal indicates as M-N, -O-M and M←OH-C complex in the phytoplankton amino acid. The β -carotene concentration is 4,97 $\mu\text{g/g}$ DW in addition Fe^{2+} 0,30 ppm and 1,95 $\mu\text{g/g}$ DW in Mn^{2+} 0,20 ppm. The dry weight concentrations of β -carotene indicates that *I. aff galbana* with Fe^{2+} addition has potential as β -carotene supplement.

Key word: *I. aff galbana*; Fe^{2+} ; Mn^{2+} ; β -carotene

PENDAHULUAN

Spesies-spesies mikroalga telah digunakan secara luas di negara-negara maju karena pertumbuhan yang lebih sederhana dibandingkan dengan tanaman tingkat tinggi (Guedes dkk, 2011). Karotenoid dari fitoplankton dapat berperan sebagai antioksidan (Wanasundara dan Shahidi, 2005), oleh karena fungsinya sebagai antioksidan maka terjadi peningkatan pemanfaatan secara komersial sebagai bahan pewarna di bidang farmasi, kosmetik dan makanan (Gouveia dkk, 2008). Aktivitas antioksidan yang kuat diketahui dari ekstrak kasar metanol *Isochrysis aff galbana*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis tetrathele* dan *Chaetoceros calcitrans* (Natrah dkk dalam Gouveia dkk, 2008). *Isochrysis aff galbana* adalah kloning *Isochrysis galbana* yang diambil dari Negara Tahiti. Selain memiliki kandungan protein yang tinggi, spesies ini juga mampu memproduksi asam lemak tidak jenuh berantai panjang (*Long chain polyunsaturated fatty acid*-LC PUFA), utamanya EPA (*eicosapentaenoic acid*) dan DHA (*docosahexaenoic acid*). *I. aff galbana* (T-iso) sangat sesuai sebagai suatu sumber nutrisi dengan pertumbuhan yang cepat. Hal ini menyebabkan *I. aff galbana* (T-iso) berpotensi pada industri

makanan sebagai sumber LC PUFA sebagai alternatif pengganti minyak ikan, menyediakan pula sterol, tokoferol dan pigmen perwarnaan (Gouveia dkk, 2008). Pada penelitian Fidalgo dkk (1998) *I. aff galbana* (T-iso) memiliki PUFA dengan konsentrasi tinggi yang terbagi atas EPA 27,66% dan DHA 14,13% dari total asam lemak.

Suplemen β -karoten merupakan salah satu pilihan sumber antioksidan (Gouveia dkk, 2008) yang dapat dikonsumsi. Namun, suplemen β -karoten produk sintetik hanya mengandung isomer trans- β -karoten (*all-trans- β -carotene*) suatu provitamin A (Hess dkk, 2005) yang akan terkonversi menjadi vitamin A. Sedangkan isomer 9-cis- β -karoten (*9-cis- β -carotene*) yang memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan trans- β -karoten (*all-trans- β -carotene*), hanya terdapat pada produk alami (*Interclinical Laboratories*, 2010). Sehingga perlu diupayakan produk alami yang dapat menghasilkan 9-cis- β -karoten yang maksimal sehingga pada penelitian ini diberikan penambahan Fe^{2+} dan Mn^{2+} masing-masing pada kultur pertumbuhan *I. aff galbana*.

Spektrofotometer infra merah (IR) digunakan untuk mengetahui data awal gugus fungsi yang berinteraksi dengan ion logam Fe^{2+} dan Mn^{2+} pada mekanisme produktivitas pembentukan β -karoten oleh jenis fitoplankton *I. aff. galbana*. Ion logam Fe dan Mn merupakan logam esensial yang terlibat dalam proses fotosintesis dan sebagai kofaktor antioksidan enzim. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan penambahan logam Fe^{2+} dan Mn^{2+} untuk mengetahui efeknya terhadap produktivitas β -karoten dalam *Isochrysis aff. galbana* (T-iso).

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat gelas yang umum digunakan, Mikroskop, *Haemocytometer* (*Neubauer-improved*), *Handcounter*, Salinometer, oven SPNISOSFD, neraca digital Ohaus NO AP 110, FT-IR SHIMADZU 820 1PC, Sentrifugasi, Sonikator Ultrasonik dan Spektrofotometer UV-VIS.

Kultur murni *Isochrysis aff. Galbana* (diperoleh dari pembudidayaan fitoplankton Jepara Yogyakarta), aseton p.a, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; medium terdiri dari Stok A ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; H_3BO_3 ; Na_2EDTA ; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; NaNO_3); Stok B (ZnCl_2 ; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Stok C (Vitamin B_{12} dan Vitamin B_1); β -karoten bubuk serta akuades.

Prosedur Kerja

1. Penyiapan Medium Conwy

Larutan nutrisi stok A 1000 mL ditambahkan dengan larutan nutrisi stok B 2 mL. Campuran larutan Conwy ini ditambahkan ke dalam air laut steril yang tidak mengandung fitoplankton dengan perbandingan 2 mL per 1000 mL air laut yang telah steril. Selanjutnya, campuran stok A dan B ditambahkan 1 tetes larutan vitamin stok C.

2. Konsentrasi Fe^{2+} dan Mn^{2+} yang dapat Ditoleransi (MTC) *I. aff galbana* (IG)

Air laut disterilkan terlebih dahulu, kemudian salinitasnya diukur dengan menggunakan salinometer dan disaring. Selanjutnya, pengenceran dilakukan untuk memperoleh salinitas air laut yang sesuai untuk spesies uji.

Untuk memperoleh kepadatan fitoplankton yang diinginkan, digunakan rumus:

$$V_1 N_1 = V_2 N_2 \quad (1)$$

Dengan V_1 adalah volume stok, N_1 adalah kepadatan sel fitoplankton stok, V_2 adalah volume

kultur dan N_2 adalah kepadatan sel fitoplankton kultur.

Setelah 3 hari, 200 mL kultur dipindahkan ke botol 500 mL dan dilakukan pengamatan setiap hari untuk penambahan Fe^{2+} dan Mn^{2+} pada *I. aff galbana*. Kepadatan sel fitoplankton diamati

melalui mikroskop dengan menggunakan *haemocytometer*, pada kondisi tanpa dan masing-masing dengan penambahan logam Fe^{2+} dan Mn^{2+} . Konsentrasi MTC (*Maximum Tolerance Concentration*) diperoleh dengan melihat pertumbuhan tertinggi pada variasi konsentrasi untuk masing-masing fitoplankton.

3. Pertumbuhan Fitoplankton

Penentuan pola pertumbuhan fitoplankton, dilakukan dengan menghitung jumlah sel per milliliter medium setiap 1 hari. Contoh diambil dengan pipet tetes, diteteskan sekitar 1-2 tetes pada *haemocytometer*, kemudian diamati melalui mikroskop. Perhitungan kepadatan sel, menggunakan rumus:

$$\text{Jumlah } \frac{\text{sel}}{\text{mL}} = \frac{\text{Jumlah sel dalam 4 kotak}}{\text{Jumlah blok (= 4)}} \times 10^4 \quad (2)$$

4. Identifikasi dengan FT IR

Identifikasi gugus fungsi yang berpotensi mengikat Fe^{2+} dan Mn^{2+} , dilakukan serangkaian kultur fitoplankton uji, tanpa dan dengan paparan ion logam pada konsentrasi MTC. Fitoplankton dipanen, dikeringkan lalu digerus dan disaring. Biomassa tanpa dan dengan paparan ion logam, dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer infra merah (IR).

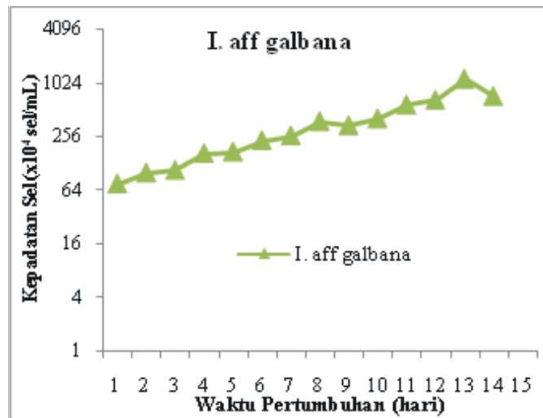
5. Ekstraksi β -karoten dengan Metode Sonikasi

Pengerjaan ini dilakukan pada ruangan dengan pencahayaan berintensitas rendah dan ruangan dingin. Biomassa fitoplankton yang diperoleh, dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan dicampur dengan aseton sebanyak 3 mL, dengan tabung tertutup kemudian disonikasi selama 50 menit pada suhu 40 °C. Sampel kemudian disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 5000 rpm dan diambil supernatannya untuk analisis β -karoten yang dibandingkan dengan standar β -karoten pada penggunaan spektroskopi UV-VIS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Pertumbuhan Sel Fitoplankton *I. aff galbana* (T-iso)

Pada penelitian ini digunakan spesies *I.aff galbana*. Pola pertumbuhan tanpa penambahan ion logam ditunjukkan pada Gambar 1. berikut ini.

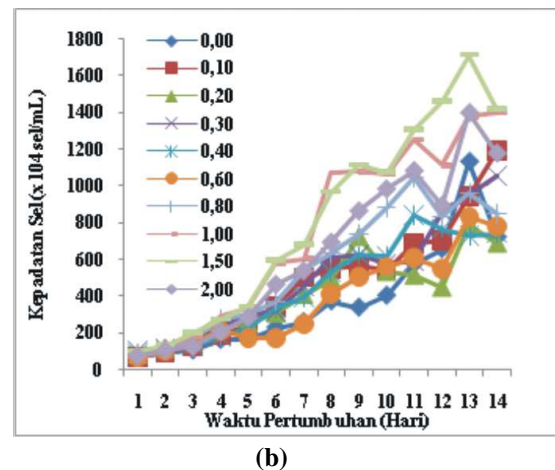
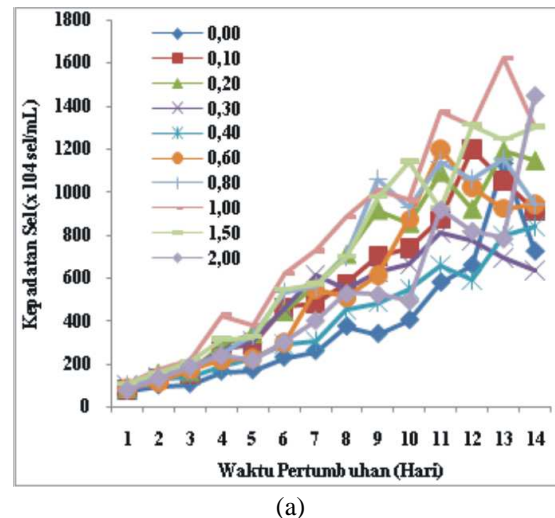


Gambar 1. Grafik Kepadatan sel Fitoplankton *I.aff galbana* (T-iso)

Pada grafik tersebut diketahui bahwa waktu pertumbuhan yang dibutuhkan *I.aff galbana* untuk beradaptasi dalam medium kultur Conwy relatif singkat yaitu dua hari. Hal ini ditunjukkan dimana hingga hari kedua kepadatan sel, belum mengalami kenaikan yang signifikan. Hari ke tiga, pembelahan sel optimal mulai terjadi.

2. Hasil Penentuan Konsentrasi Fe^{2+} dan Mn^{2+} yang dapat Ditoleransi (MTC) oleh Fitoplankton *I. aff galbana* (T-iso)

Kultur terhadap spesies uji dilakukan penambahan masing-masing dengan ion logam Fe^{2+} dan Mn^{2+} untuk berbagai variasi konsentrasi. Penambahan ion logam mulai dilakukan pada hari ketiga pengkulturan. Pengamatan dan penghitungan kepadatan sel dilakukan setiap hari hingga diperoleh grafik pertumbuhan sel (Gambar 2).



Gambar 2. Pola Pertumbuhan Sel *I. aff galbana* (a) tanpa dan Paparan Fe^{2+} dan (b) tanpa dan Paparan Mn^{2+} pada berbagai Konsentrasi

Konsentrasi Fe^{2+} yang dapat ditoleransi oleh *I. aff galbana* ditampilkan pada Gambar 2. Gambar ini memperlihatkan pola pertumbuhan kepadatan sel *I. aff galbana* tanpa dan dengan penambahan Fe^{2+} untuk berbagai konsentrasi (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5 dan 2,0 ppm). Pola pertumbuhan untuk kontrol dan semua variasi konsentrasi memperlihatkan pola yang relatif sama. Pengamatan dihentikan pada hari ke-14, dimana pertumbuhan fitoplankton tinggi terjadi pada hari ke-13 untuk konsentrasi Fe^{2+} 1,0 ppm (1620×10^4 sel/mL) dan pertumbuhan rendah pada hari yang sama adalah 0,3 ppm (695×10^4 sel/mL).

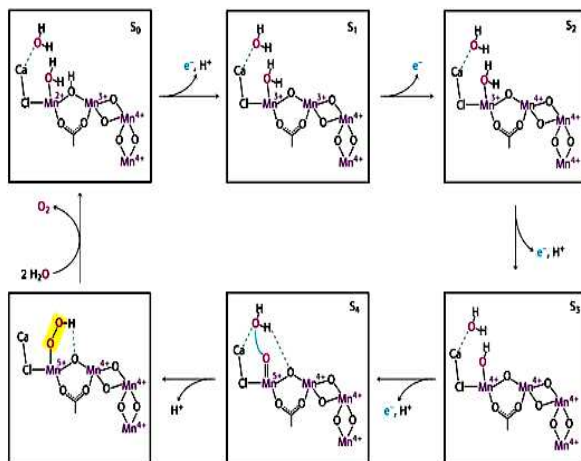
Pada Gambar 2 (b) menunjukkan pola pertumbuhan kepadatan sel *I. aff galbana* tanpa dan dengan penambahan Mn^{2+} berbagai konsentrasi (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5 dan 2,0 ppm).

Kontrol (0,0 ppm) dan semua variasi konsentrasi memperlihatkan pola pertumbuhan yang sama, dimana terjadi penurunan pada hari ke-14. Pengamatan terakhir dilakukan pada hari ke-14 dengan merujuk kecenderungan pola pertumbuhan tersebut. Pertumbuhan tinggi pada fitoplankton dengan penambahan Mn^{2+} diberikan oleh 1,5 ppm (1710×10^4 sel/mL) pada hari ke-13 dan pertumbuhan rendah (730×10^4 sel/mL) diberikan pada konsentrasi 0,4 ppm pada hari yang sama. Konsentrasi maksimum Fe^{2+} yang dapat ditoleransi pada *I. aff galbana* ialah pada konsentrasi 1,0 dan 1,5 ppm untuk Mn^{2+} .

Pada mikroalga, ion logam Fe memainkan peran sangat penting dalam regulasi metabolisme sel sebagai unsur esensial, sebagai tambahan nutrisi dan membantu proses fotosintesis (Matsuzawa dkk, 2004; Pessarakli, 2005; Millaleo dkk, 2010; Allen dkk, 2011). Penambahan konsentrasi Fe^{2+} yang agak tinggi pada *I. aff galbana* memberikan pertumbuhan yang

tinggi. Dinding sel yang agak keras pada spesies ini ditengarai dapat menyebabkan absorpsi nutrisi tidak begitu mudah sehingga dengan penambahan 1,0 ppm Fe^{2+} masih bersifat nutrisi yang membantu perkembangan sel.

Hal yang sangat menarik teramati dari penambahan Mn^{2+} pada konsentrasi tinggi 1,5 ppm. Pertumbuhan tinggi ditunjukkan pada penambahan Mn^{2+} . Sementara pertumbuhan rendah berada pada daerah konsentrasi yang rendah, ini menunjukkan pada proses fotosintesis lebih membutuhkan ion logam Mn untuk memproduksi O_2 yang terletak pada proses fotosistem II (FS II) (Gambar 3).

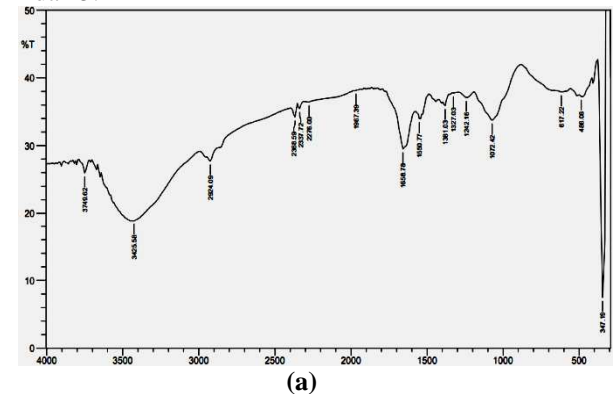


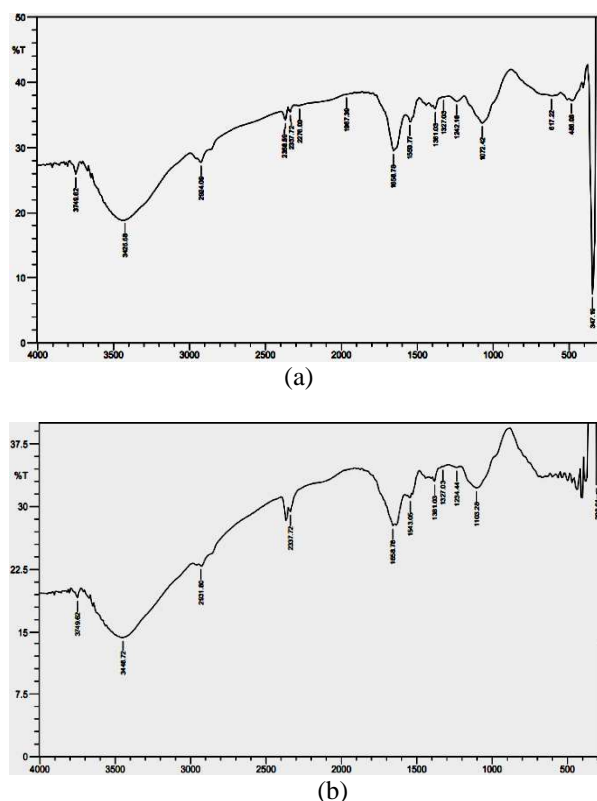
Gambar 3. Mekanisme Reaksi Tahapan Fotokimia yang Melibatkan Pelepasan Elektron ($2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$) pada PS II (Sumber: Miles, B., 2003)

Peran penting ion logam Mn pada proses fotosintesis terletak pada sistem pemecahan air pada fotosistem II, yang menyiapkan elektron untuk transfer elektron fotosintesis. Kelompok yang terdiri dari empat Mn berasosiasi dengan kompleks oksigen (OEC_Oxygen Evolving Complex) terikat pada protein fotosistem II (PSII) (Millaleo dkk, 2010). *I. aff galbana* membutuhkan konsentrasi Mn^{2+} yang lebih tinggi untuk pembelahan dan perkembangan selnya, yang mana diketahui dalam Chrichton (2005) dan Millaleo dkk (2010) bahwa ion logam Mn berfungsi dalam proses fotosintesis dan struktur sel.

3. Identifikasi Gugus Fungsi *I. aff galbana* dengan Penambahan Fe^{2+} dan Mn^{2+}

Identifikasi gugus dan identifikasi interaksi yang mungkin terjadi antara ion logam dan fitoplankton dilakukan dengan menggunakan spektroskopi Infra merah. Berikut spektrumnya disajikan pada gambar 4 dan 5.



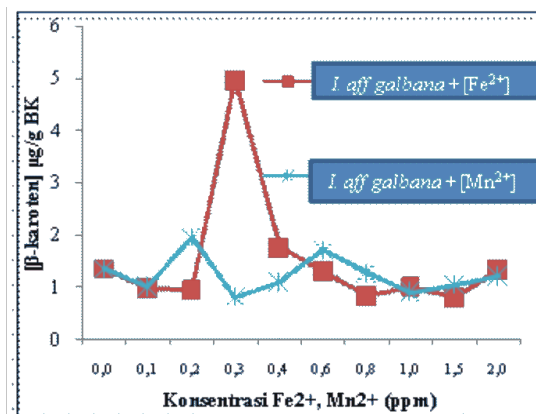


Gambar 5. Spektrum IR biomassa *I. aff galbana* (IG), a) IG; b) IG + Mn^{2+}

Kemungkinan pengikatan untuk spesies *I. aff galbana* (gambar 4 dan 5) memperlihatkan interaksi M-N dengan penambahan Fe^{2+} serta Mn^{2+} . Interaksi $-\text{O}-\text{M}$ pada 408,91 dan 493,78 cm^{-1} untuk penambahan Fe^{2+} . Puncak ini mendukung adanya senyawa kompleks $\text{M}-\text{OH}-\text{C}$ yang terbentuk pada penambahan Fe^{2+} yang ditunjukkan pada daerah 3448,72 cm^{-1} . Penambahan Mn^{2+} menunjukkan interaksi $-\text{O}-\text{M}$ pada daerah 450 dan 493,78 cm^{-1} . Pergeseran kecil pada daerah bilangan gelombang 3417,86 cm^{-1} menunjukkan interaksi gugus fungsi (ikatan van der Waals atau hidrogen). Analisis data IR yang menunjukkan adanya senyawa kompleks $\text{M}-\text{OH}-\text{C}$, mendukung fungsi Fe^{2+} dan Mn^{2+} sebagai kofaktor enzim.

4. Data Analisis β -Karoten pada *I. aff galbana* untuk Penambahan Fe^{2+} dan Mn^{2+}

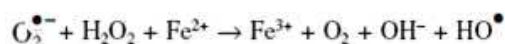
Biomassa masing-masing spesies diekstraksi, baik dengan penambahan Fe^{2+} maupun dengan penambahan Mn^{2+} pada berbagai konsentrasi. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode sonikasi untuk mengefisienkan waktu dan mendapatkan ekstrak yang lebih banyak serta digunakan volume pelarut yang lebih sedikit. Metode ini memanfaatkan gelombang ultrasonik yang dapat menghancurkan sel sehingga mempercepat proses pemindahan massa senyawa dari dalam sel ke pelarut.



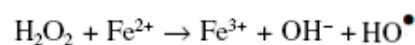
Gambar 6 . Grafik Analisis β -karoten pada *I. aff galbana* (IG) pada Penambahan Fe^{2+} atau Mn^{2+} pada berbagai Konsentrasi

Pada penambahan Fe^{2+} (Gambar 6), menunjukkan konsentrasi β -karoten yang tinggi pada spesies ini, dengan penambahan Fe^{2+} dibandingkan Mn^{2+} . Konsentrasi berat kering pada *I. aff galbana* diperoleh 4,97 $\mu\text{g/g}$ untuk penambahan 0,30 ppm Fe^{2+} . Jika dibandingkan dengan kontrol, maka perbedaan yang sangat signifikan terjadi pada spesies *I. aff galbana* yaitu 3,5 kali berat kering kontrol. Jika diamati, terlihat bahwa konsentrasi ini sama dengan penambahan konsentrasi Fe^{2+} yang memberikan pertumbuhan rendah. Pertumbuhan rendah pada produktifitas karotenoid juga dinyatakan oleh Hadi dkk (2008) dalam artikelnya.

Penelitian tentang pertumbuhan rendah yang diikuti dengan penurunan jumlah biomassa terjadi pula pada jenis *Haemotococcus pluvialis* dengan penambahan Fe^{2+} -EDTA oleh Cai dkk (2009). Pertumbuhan rendah tersebut, kemungkinan disebabkan oleh Fe^{2+} merupakan katalis yang efektif dalam memecah H_2O_2 (Manahan, 2003; Koolman dan Roehm, 2005) yang diproduksi dari anion radikal superoksida oleh aksi enzim dismutase superoksida. Enzim katalase inilah yang menyebabkan hidrogen peroksida memproduksi O_2 dan H_2O . Namun, dengan adanya Fe^{2+} sebagai katalis maka akan menghasilkan radikal hidroksil (OH^\bullet), diberikan pada reaksi Haber-Weiss (Manahan, 2003):



dan juga pada reaksi Fenton (Manahan, 2003):



sehingga memicu peningkatan produktifitas β -karoten sebagai salah satu jenis antioksidan dalam proses perlindungan sel dari senyawa radikal.

Penambahan Mn^{2+} (Gambar 5), memperlihatkan konsentrasi berat kering *I. aff galbana* (1,95 $\mu\text{g/g}$), 0,20 ppm. Data ini dibandingkan dengan kontrol memberikan perbedaan signifikan dengan *I. aff galbana* diperoleh 1,5 kali konsentrasi berat kering.

Secara umum, konsentrasi berat kering β -karoten pada spesies ini tidak terlalu dipengaruhi oleh penambahan Mn^{2+} . Hal ini kemungkinan terjadi dimana ion logam Mn memiliki potensial reduksi yang kecil dibandingkan ion logam Fe. Selain itu, Mn^{2+} memiliki peran yang dominan sebagai kofaktor dari katalase, peroksidase dan superoksidase (SOD) yang memainkan peran protektif terhadap tekanan radikal (Manahan, 2003).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Penambahan Fe^{2+} secara umum memiliki pengaruh yang lebih besar dibandingkan dengan penambahan Mn^{2+} untuk produksi β -karoten.
2. Interaksi logam Fe^{2+} dan Mn^{2+} terhadap fitoplankton uji didominasi oleh pembentukan senyawa kompleks $\text{M}-\text{OH}-\text{C}$.
3. Peningkatan produktifitas konsentrasi berat kering β -karoten tertinggi yaitu 4,97 $\mu\text{g/g}$ BK pada penambahan Fe^{2+} 0,3 ppm dan 1,95 $\mu\text{g/g}$ BK pada penambahan Mn^{2+} 0,2 ppm pada *I. aff galbana*.
4. *I. aff galbana* dengan penambahan Fe^{2+} berpotensi dikembangkan sebagai suplemen β -karoten.

DAFTAR PUSTAKA

- Allen, J. F., de Paula, B. M. W., Puthiyaveetil, S., dan Nield, J., 2011, Review: A structural Phylogenetic Map for Chloroplast Photosynthesis, *Trends in Plant Science*, **16** (12): 645-655.
- Cai, M., Zhe, L. dan Anxiang, Q., 2009, Effect of Iron Electrovalence and Spesies on Growth and Astaxanthin Production of *Haemotococcus pluvialis*, *Chin. J. Oceanol. Limnol*, **27** (2) : 370-375.
- Fidalgo, J. P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A. dan Herrero, A., 1998, Effect of Nitrogen Source and Growth Phase on Proximate Biochemical Composition, Lipid Classes and Fatty Acid Profile of The Marine Microalga *Isochrysis aff. galbana*, *Aquaculture*, **166**:105-116.
- Gouveia, L., Batista, A. P., Sousa, I., Raymundo, A. dan Bandarra, N. M., 2008, Microalgae in Novel Food Product, *Food Chemistry Research Developments*, Nova Science Publishers, Inc: 1-37.
- Guedes, A. C., Amaro, H. M. dan Malcata, F. X., 2011, Microalgae As Source of High Added-Value Compound-Brief Riview of Recent Work, *Biotechnol. Prog*, **27** (3): 597-613.
- Hadi, M. R., Shariati, M. dan Afsharzadeh, S., 2008, Microalgal Biotechnology: Carotenoid and Glycerol Production by The Green Algae *Dunaliella* Isolated from the Gave-Khooni Salt Marsh, Iran, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **13**: 540-544.
- Hess, S. Y., Thurnham, D. I. dan Hurrell, R. F., 2005, Technical Monograph Series: Influence of Provitamin A Carotenoids of Iron, Zinc and Vitamin A Status, Harvest Plus-UK: 4-28.
- Interclinical Laboratories, 2010, *Dunaliella salina*-Marine Phytoplankton, Botanical Monograph, Interclinical Laboratories Pty Limited, Australia.
- Li, M., Ahu, Q., Hu, C. W., Chen, L., Liu, Z. L. dan Kong, Z.M., 2007, Abstrak: Cobalt and Manganese Stress in the Microalga *Pavlova viridis* (*Prymnesiophyceae*): Effect on Lipid Peroxidation and Antioxidant enzymes, *J. Environ Sci*, **19** (11): 1330-1335.
- Manahan, S., 2002, *Toicological Chemistry and Biochemistry*, CRC Press, USA: 401.
- Matsuzawa, T., Sera, K., Futatsugawa, S. dan Shiraiwa, Y., 2004, Abstrack: Change in element composition of microalgal cells under iron-deficient conditions: basic study on homeostasis of element utilization, *NMCC Annual Report*, **12**: 103.
- Miles, B., 2003, *Photosystem I and II*, (online), (<http://www.tamu.edu/faculty/bmiles/lectures/photosystems.pdf>, 27 Juli 2012)
- Millaleo, R., Reyes-Diaz, M., Ivanov, A. G., Mora, M. L. dan Alberdi, M., 2010, Manganese as Essential and Toxic Element for Plants: Transport, Accumulation and Resistance and Mechanisms, *J. Soil Sci.Plant Nutr*, **10** (4): 476-494.
- Pessarakli, M., 2005, *Handbook of Photosynthesis-Chapter 44: Heavy Metal Toxicity Induced Alteration in Photosynthetic Metabolims in Plants*, 2nd edition, CRC Press, USA: 2.
- Wanasundara, P. K. J. P. D. dan Shahidi, F., 2005, *Antioxidants: Science, Technology and Applications*, John Wiley and Son's: 431-442.